

札幌医誌 60 (6) 491~500 (1991)

培養皮膚線維芽細胞における Glucosylceramide の 代謝に関する研究

— Gaucher 病各型における Glucosylceramide の
細胞内代謝と機能異常の関連について —

杉 山 元 工 藤 亨

札幌医科大学小児科学講座 (主任 千葉峻三 教授)

Glucosylceramide Metabolism in Cultured Skin Fibroblasts from Patients with Gaucher Disease

Hajime SUGIYAMA and Tooru KUDOH

Department of Pediatrics, Sapporo Medical College

(Chief : Prof. S. CHIBA)

ABSTRACT Gaucher disease, a glycosphingolipid storage disease, is characterized by deficient activity of acid β -glucosidase, a lysosomal enzyme. The clinical manifestations of this disease are the result of accumulation of glucosylceramide (glc-cer), primarily within cells of monocyte/macrophage origin. Gaucher disease has been classified into three phenotypes based on the presence and severity of central nervous system involvement: Type 1, non-neuropathic; Type 2, acute neuropathic; and Type 3, subacute neuropathic.

The aim of this study was to demonstrate differences in glc-cer metabolism and the distribution of its metabolites in the fibroblasts of patients with Gaucher disease type 1 and 2 and controls, and to explain the possible pathogenesis of neuronal dysfunction in this disease.

(^{14}C)stearic-acid labeled glc-cer-albumin complex was added to the fibroblasts of patients with Gaucher disease type 1 and 2 and controls. The fibroblasts were then subjected to subcellular fractionation using Percoll solution. Each of the lipid fractions, especially glc-cer and its metabolites, was analyzed.

More glc-cer was demonstrated in the plasma membrane fraction than in the other fractions, in both Gaucher disease and control fibroblasts. Moreover, the highest proportion of glc-cer was distributed in the plasma membrane fraction of Gaucher disease type 2, the most severe clinical phenotype, and the lowest proportion in the corresponding fraction of the controls. Such changes of lipid composition on the cell surface, when they occur in neurons, may lead to significant neurological impairment. The extent of imbalance in glc-cer distribution in plasma membranes was well correlated with the severity of the disease. (Received September 27, 1991 and accepted October 8, 1991)

Key words: Gaucher disease, Glucosylceramide, Lysosomal acid β -glucosidase

1 緒 言

スフィンゴ糖脂質は生体膜の重要な脂質であり、特に神経細胞の膜に多く含まれている。この脂質は、膜

の安定、神経伝導、レセプターの活動、癌化の他に、成長、分化、生存に関する機能で重要な働きをしている。

glucosylceramide (Glc-cer) はスフィンゴ糖脂質の異化経路の末端に位置している。より高次のスフィン

ゴ糖脂質やガングリオンドは特異的な酸性水解酵素によって段階的に分解されて Glc-cer に至る。さらに Glc-cer は Glc-cer β -glucosidase によってセラミドとグルコースに分解される。

Gaucher 病は Glc-cer β -glucosidase 活性が低下し、多量の Glc-cer が肝・脾を中心とした網内系に蓄積する先天性代謝異常症である。Gaucher 病には病型の異なる 3 つの型があり、type 1, 2 および 3 と分類されている。type 1 は成人型と呼ばれ、神経症状は認められず、肝脾腫、脾機能亢進に基づく貧血、血小板減少を主徴とし慢性に経過する。type 2 は乳児型と呼ばれ、肝脾腫とともに、発育障害、神経症状が乳児期から認められ早期に死亡する。type 3 は若年型と呼ばれ、運動障害、知能低下、痙攣、脳波異常などの神経症状が認められるが、type 2 にくらべて進行が遅く、乳児期以降に神経症状が出現する。

神経病理学的には、type 1 の患者の脳では前頭葉の皮質下の一部で血管周囲に Gaucher 細胞がみられるものの、神経細胞の病変はみられていない¹⁾。type 2 の患者では神経細胞そのものの異常が知られ、神経症状との相関がみられている²⁾。type 3 の患者の神経細胞病変の存在については、有る無い両方の報告があり一定していない^{3,4)}。脳中の Glc-cer の量については、種々の程度の中樞神経症状を示す type 2 と type 3 では大脳および小脳の皮質と白質でわずかに増加していることが報告されている^{3,4)}。しかしながら、神経症状を示さない type 1 でも極めてわずかの増量がみられている¹⁾。この他 glucosylsphingosine, lactosylsphingosine あるいは一部のガングリオンドなどの脂質の蓄積の報告もある³⁻⁵⁾。

酵素学的には、臨床症状の大きく異なる type 1 と type 2 の培養皮膚線維芽細胞の Glc-cer β -glucosidase 活性はいずれも低下しており、臨床症状との相関に乏しい。これまでに我々は、¹⁴C-脂肪酸標識 Glc-cer の type 1 と type 2 培養皮膚線維芽細胞内での分解は、中樞神経症状を示す type 2 でより障害されていたことを報告した⁶⁾。今回著者らはこの事実に基づき Glc-cer 蓄積が Gaucher 病の細胞機能異常に及ぼす影響を解明するために培養皮膚線維芽細胞を用いて Glc-cer の取り込みの機構、Glc-cer の細胞内代謝および細胞内分布について検索し、機能異常との関連について研究した。

2 実験方法

皮膚線維芽細胞の培養、¹⁴C-ステアリン酸標識 Glc-

cer の調製、放射性培地の調製の大要は草野⁶⁾の方法に従った。

2・1 皮膚線維芽細胞の培養

type 1 Gaucher 病 3 例、type 2 Gaucher 病 2 例、及び対照として、先天性代謝異常症を疑われたが、酵素学的に正常と診断された 5 例より得られた皮膚線維芽細胞を 10% 牛胎児血清 (FCS) を含む Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) で培養した。

2・2 ¹⁴C-ステアリン酸標識 Glc-cer (¹⁴C-Glc-cer) の調製

Erickson and Radin⁷⁾の方法により、Gaucher 病患者脾臓より得られた Glc-cer から glucosylsphingosine を調製し、[1-¹⁴C]ステアリン酸 (50 mCi/mmol, New England Nuclear) をチオニルクロリド中でクロリド化し、両者をカップリング後、生成した ¹⁴C-Glc-cer を純化した。

得られた ¹⁴C-Glc-cer の放射能純度は 99% で、Ledeen and Salsman⁸⁾の方法によるメタノリシス後の分析から、分子内の放射能分布は脂肪酸部分に 99% 分布していることが確認された。¹⁴C-Glc-cer の比放射活性は、放射能測定とアンスロン法による Glc-cer 定量から計算した。得られた ¹⁴C-Glc-cer をクロロホルム：メタノール溶液 (2 : 1, v/v) に溶解し、非標識 Glc-cer を適当量加えて希釈し、以下の実験に使用した。

2・3 放射性培地の調製

Barton and Rosenberg⁹⁾の方法を一部改変した方法⁶⁾により ¹⁴C-Glc-cer-albumin complex を作製した。使用した Glc-cer の量、牛血清アルブミン (BSA) の量、FCS の濃度はそれぞれの実験で指定の数値に変更して用いた。

2・4 標識酵素

ゴルジ装置の標識酵素として galactosyltransferase を Lipsky and Pagano¹⁰⁾の方法、形質膜の標識酵素として 5'-nucleotidase を Morr  ¹¹⁾の方法で測定した。ライソソームの標識酵素として 4-methylumbelliferyl (4-MU)- β -galactopyranoside (Koch-Light) を基質として β -galactosidase を¹²⁾、また 4-MU-2-acetamido-2-deoxy- β -glucopyranoside (Koch-Light) を基質として β -hexosaminidase を¹³⁾測定した。

2・5 ¹⁴C-Glc-cer の細胞内取り込み、及び第一 Per-coll 密度分画

細胞が confluent に達した後に、培地を除去し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) にて 3 回洗浄後、上記 2・3 によって得られた放射性培地 (¹⁴C-Glc-cer 40 nmol を含む 4 ml の培養液) を加え 5% CO₂ 下で培養した。培養開

始後、一定の時間後に放射性培地を除去し、細胞を生理食塩水で3回洗浄後、0.25%トリプシン-0.01% EDTAを含むPBSにて細胞を剥離し、ポッターホモジナイザーに集めた。細胞浮遊液を遠心して回収した細胞を、冷却生理食塩水にて3回洗浄した。

細胞分画は自己形成勾配媒体 Percoll (Pharmacia Inc.) を用いる Banerjee *et al*¹⁴⁾ の方法を一部改変して行った。洗浄した細胞を 600 μ l の sucrose/EDTA 溶液 (0.25 M sucrose, 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 50 μ g bovine serum albumin/ml) に浮遊させ氷冷下でホモジナイズ (1,000 回転で5往復) した。このホモジネイトを 800 g 5 分間遠心後、上清を取り除き、沈査に再び 600 μ l の sucrose/EDTA 溶液を加え再度ホモジナイズ後遠心し、得られた上清に先の上清を合わせこれを全上清とした。全上清の一部で放射能の測定、蛋白量の測定¹⁵⁾、脂質抽出を行い、残りをさらに以下の実験に用いた。先ず遠心管に Percoll 溶液 (比重 1.149) を 1 ml を加え、これに sucrose/EDTA 溶液 (Percoll で比重 1.050 に調整) を 4 ml 重層し、さらにこの上に全上清を 1 ml 重層した。これを、スイングローター (Damon, type no. A-203) を用い、超遠心機 (International, IEC-B-60) により 30,000 g, 20 分間遠心した。遠心後、フラクションコレクター (ISCO, model 640) で遠心管の上方から 400 μ l を一分画として、合計 15 分画を得、おのおのの分画の一部の放射能の測定、標識酵素活性測定、さらに脂質抽出を行った。

2.6 脂質の抽出及び代謝産物の同定

2.5 で得られた全上清およびそれぞれの分画から脂質を抽出した。Percoll を含む分画はアングルロータ (Hitachi, RP100AT) および小型超遠心機 (Hitachi, CP100H) を用いて 100,000 g, 90 分間遠心し Percoll を取り除いて脂質を抽出した。抽出には5倍量のクロロホルム:メタノール溶液 (2:1, v/v) を加え、十分混和後、遠心により2層に分配した。下層の脂質抽出液の一部を展開溶媒クロロホルム:メタノール:水 (72:24:3, v/v) を用いて、薄層クロマトグラフィー (薄層プレート Silica Gel 60, Merck) にて分画し、オートラジオグラムを作製後、放射性代謝産物を識別した。¹⁴C-Glc-cer 及びそれぞれの放射性代謝産物に相当する部分をプレートより剥離し、放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

代謝産物の同定・分析は前述の方法⁶⁾に従った。各種脂質標品としてホスファチジルイノシトール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、セラミド (スフィンゴミエリン

のホスホリパーゼ C 処理より得た)、コレステロールステアレート (以上 Sigma Chemical Co.) を使用した。Glc-cer β -glucosidase 活性は、分解されずに残存した ¹⁴C-Glc-cer の % 分布にて表わした。

2.7 第二 Percoll 密度分画

第一 Percoll 密度分画で分画されない形質膜とゴルジ装置分画 (light membrane fraction) をさらに分画するために第二 Percoll 密度分画を Merion and Sly¹⁶⁾ の方法を一部改変して行った。遠心管に Percoll 溶液 (比重 1.149) を 1 ml を加え、これに sucrose/EDTA 溶液 (Percoll で比重 1.044 に調整) を 4 ml 重層し、さらにこの上に light membrane fraction 1 ml を重層し、第一 Percoll 密度分画と同様に遠心し、合計 15 分画を得た。得られた分画の一部で放射能の測定、標識酵素活性測定を行った。

3 実験結果

3.1 ¹⁴C-Glc-cer の取り込みに対する FCS 濃度の影響

対照皮膚線維芽細胞 (4 例) を用いた。40 nmole の ¹⁴C-Glc-cer に対し BSA 濃度 25 mg/ml の PBS 0.5

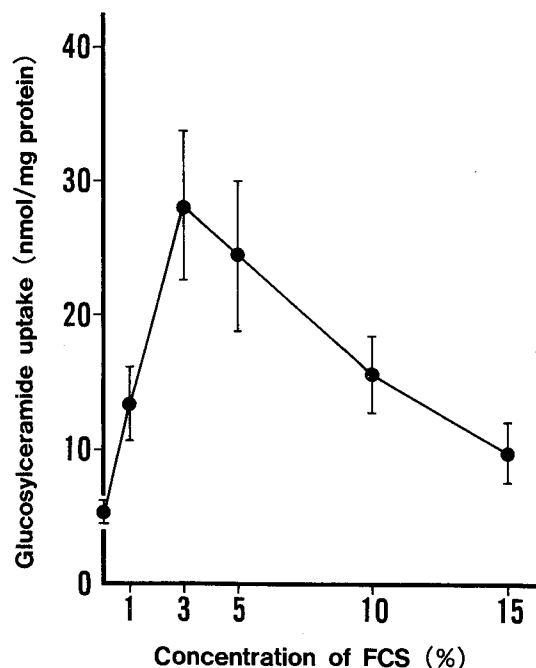


Fig. 1 Effect of FCS concentration on glucosylceramide (Glc-cer) uptake by cultured control skin fibroblasts. Control cells (n=4) were pulsed for 48 h with 40 nmol of ¹⁴C-Glc-cer at variable concentrations of FCS. The uptake of Glc-cer is expressed as nmol/mg protein (mean \pm SD).

ml を加え ^{14}C -Glc-cer-albumin complex を作製した。FCS 濃度 0, 1, 3, 5, 10, 15% の MEM 培養液 3.5 ml をそれぞれ加え 1 dish (10 cm²) あたりの放射性培地として培養し、48 時間後の取り込まれた ^{14}C -Glc-cer 量を細胞の蛋白当りの量で示した (Fig. 1)。FCS の存在で取り込みは増大し、濃度 3% で最大の取り込みがみられた。

3・2 ^{14}C -Glc-cer の取り込みに対する BSA の濃度の影響

対照皮膚線維芽細胞 (4 例) を用いた。40 nmole の ^{14}C -Glc-cer に対し、BSA 濃度 5, 10, 15, 20, 40, 60 mg/ml の PBS 0.5 ml をそれぞれ加え complex を作製した。3% FCS を含む MEM 培養液 3.5 ml を加え培養し、48 時間後の取り込まれた ^{14}C -Glc-cer 量を細胞の蛋白当りの量で示した (Fig. 2)。BSA 濃度 5 mg/ml から 40 mg/ml の濃度で十分量の取り込みがみられた。

3・3 ^{14}C -Glc-cer 取り込みの時間的経過

3・1 および 3・2 の結果から、対照皮膚線維芽細胞 (4 例) を用い 1 dish あたり 40 nmole の ^{14}C -Glc-cer に対し、BSA 濃度 25 mg/ml の PBS 0.5 ml を加え ^{14}C -

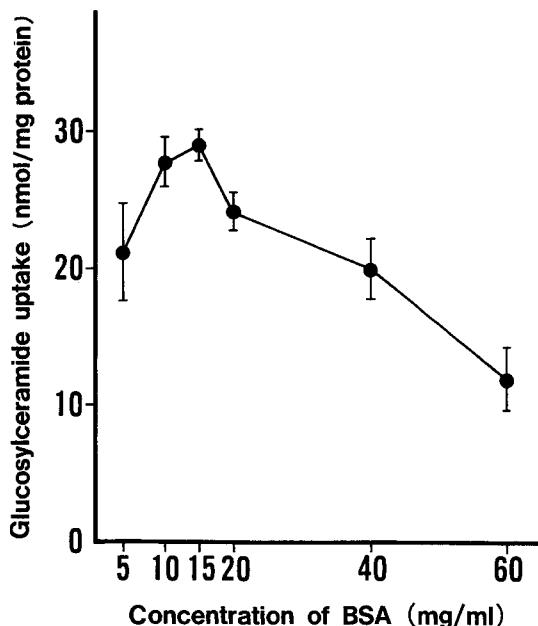


Fig. 2 Effect of BSA concentration on glucosylceramide (Glc-cer) uptake by cultured control skin fibroblasts. Control cells (n=4) were pulsed for 48 h with 40 nmol of ^{14}C -Glc-cer at variable concentrations of BSA. The uptake of Glc-cer is expressed as nmol/mg protein (mean \pm SD).

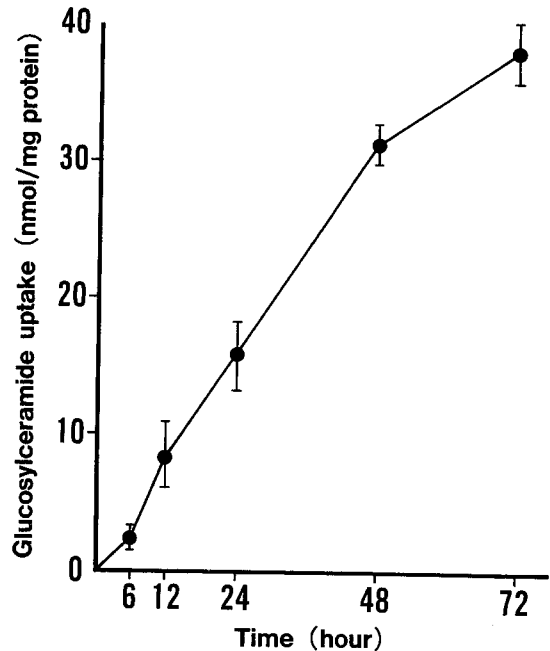


Fig. 3 The time course of glucosylceramide (Glc-cer) uptake by cultured control skin fibroblasts. Control cells (n=4) were pulsed with 4 ml of complete medium containing 40 nmol of ^{14}C -Glc-cer, 3% FCS and 0.5 ml of 25 mg/ml BSA in PBS. The uptake of Glc-cer is expressed as nmol/mg protein (mean \pm SD).

Glc-cer-albumin complex を作製し、3% FCS を含む MEM 培養液 3.5 ml を加えそれぞれ 6, 12, 24, 48, 72 時間培養した。取り込まれた ^{14}C -Glc-cer 量を細胞の蛋白当りの量で示した (Fig. 3)。培養時間とともに取り込み量は増加し、48 時間以後では取り込みの減少傾向がみられた。

3・4 ^{14}C -Glc-cer の細胞内代謝と第一 Percoll 密度分画による細胞内分布

対照, type 1 Gaucher 病, および type 2 Gaucher 病皮膚線維芽細胞の各 dish に 3・3 の条件で 40 nmole の ^{14}C -Glc-cer を含む培養液で 48 時間培養し、 ^{14}C -Glc-cer の各細胞内代謝と細胞内分布を検討した。

対照皮膚線維芽細胞の第一 Percoll 分画後の galactosyltransferase と 5'-nucleotidase 活性は第 1 から第 4 分画に認められた。これらの活性は互いに重なりあい分離されないため light membrane fraction とした。標識酵素からこの分画にはゴルジ装置および形質膜が主に含まれている。 β -galactosidase と β -hexosaminidase は第 13 分画に単一のピークを示すことか

ら、この分画を lysosomal fraction とした。これらの分画パターンは対照および Gaucher 病線維芽細胞で同様であることから、light membrane fraction, lysosomal fraction 各々の標識酵素として 5'-nucleotidase, β -galactosidase 活性を、以下の Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6 に示した。放射能および標識酵素活性は最大値を示した画分の値を 100% として示した。放射能の分布は 2 峰性であり、その大部分は light membrane fraction に、一部は lysosomal fraction に一致していた。従って ^{14}C -Glc-cer およびその代謝産物は、主にこの light membrane fraction に存在することになる。

対照のそれぞれの画分における放射性代謝産物のオートラジオグラムでは (Fig. 4), まず全上清の脂質のレーン (T.S.) で ^{14}C -Glc-cer とその分解産物のセラミドおよび $1\text{-}^{14}\text{C}$ ステアリン酸、さらに $1\text{-}^{14}\text{C}$ ステアリン酸が利用されて生合成された中性脂質およびリン脂質がみられた。light membrane fraction のレーン (Fr. 2) では、全上清のレーンより Glc-cer のスポットが相対的にやや強くみられるものの全体としては全上清と同

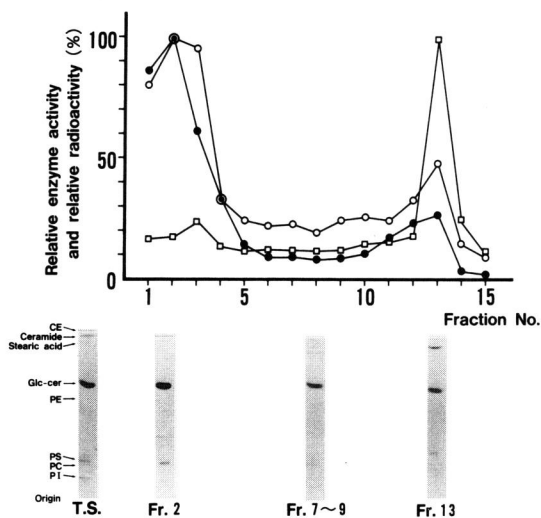


Fig. 4 Percoll gradient profiles of the marker enzyme activities of subcellular fractions. Control cells were pulsed for 48 h with 40 nmol of ^{14}C -Glc-cer and subjected to the first Percoll gradient (density 1.050 g/ml). Autoradiogram of lipids extracted from total supernatant (T.S.), fraction 2 (Fr. 2, light membrane fraction), fraction 7-9 (Fr. 7-9), and fraction 13 (Fr. 13, lysosomal fraction)

●; radioactivity CE, cholesterol ester
○; 5'-nucleotidase PE, phosphatidylethanolamine
□; β -galactosidase PS, phosphatidylserine
PC, phosphatidylcholine
PI, phosphatidylinositol

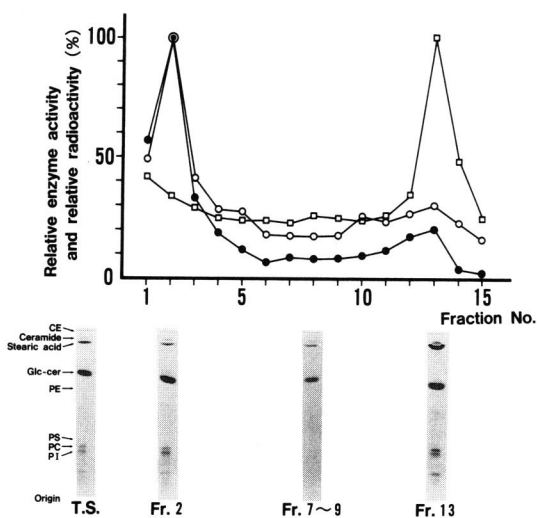


Fig. 5 Percoll gradient profiles of the marker enzyme activities of subcellular fractions. Fibroblasts of type 1 Gaucher disease were pulsed for 48 h with 40 nmol of ^{14}C -Glc-cer and subjected to the first Percoll gradient (density 1.050 g/ml). Autoradiogram of lipids extracted from total supernatant (T.S.), fraction 2 (Fr. 2, light membrane fraction), fraction 7-9 (Fr. 7-9) and fraction 13 (Fr. 13, lysosomal fraction)

●; radioactivity CE, cholesterol ester
○; 5'-nucleotidase PE, phosphatidylethanolamine
□; β -galactosidase PS, phosphatidylserine
PC, phosphatidylcholine
PI, phosphatidylinositol

様の傾向を示した。lysosomal fraction のレーン (Fr. 13) では Glc-cer のスポットが相対的に弱く逆にセラミドのスポットが強くみられた。第 7・第 8・第 9 を合わせた分画 (Fr. 7~9) のレーンでは Glc-cer とセラミドのスポットが主体ではあるが、他の代謝産物のスポットもみられ、light membrane fraction と lysosomal fraction の中間分布であった。

Type 1 Gaucher 病では (Fig. 5), 放射能の分布は対照とほぼ同様で light membrane fraction (Fr. 2) にその大部分が存在する。各分画での放射性代謝産物のオートラジオグラムから全上清のみならず、全てのレーンで対照よりも Glc-cer のスポットが相対的に強くみられた。lysosomal fraction のレーン (Fr. 13) のセラミドのスポットは、この細胞の他のレーンあるいはコントロールの lysosomal fraction のレーンと比べて相対的に最も強かった。

Type 2 Gaucher 病での放射能分布 (Fig. 6) も対照とほぼ同様であった。各分画での放射性代謝産物のな

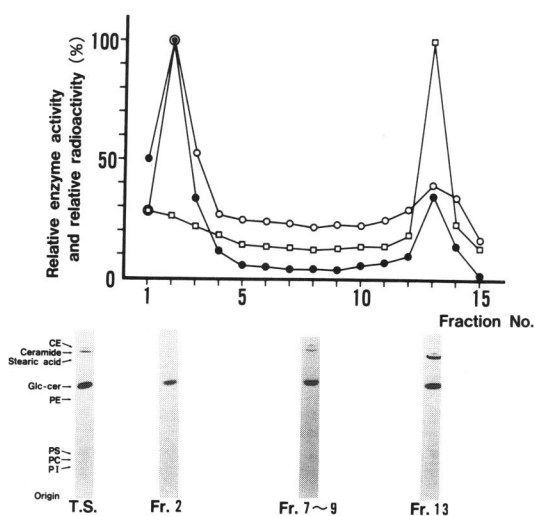


Fig. 6 Percoll gradient profiles of the marker enzyme activities of subcellular fractions. Fibroblasts of type 2 Gaucher disease were pulsed for 48 h with 40 nmol of ^{14}C -Glc-cer and subjected to the first Percoll gradient (density 1.050 g/ml). Autoradiogram of lipids extracted from total supernatant (T.S.), fraction 2 (Fr. 2, light membrane fraction), fraction 7-9 (Fr. 7-9) and fraction 13 (Fr. 13, lysosomal fraction)

- ; radioactivity CE, cholesterol ester
- ; 5'-nucleotidase PE, phosphatidylethanolamine
- ; β-galactosidase PS, phosphatidylserine
- PC, phosphatidylcholine
- PI, phosphatidylinositol

かで Glc-cer のスポットが全てのレーンで相対的に強くみられた。リン脂質は全体に少なく特に lysosomal fraction のレーン (Fr. 13) に顕著であった。セラミドのスポットは light membrane fraction (Fr. 2) と fraction 7-9 (Fr. 7-9) のレーンでは弱く、lysosomal fraction のレーンでは type 1 Gaucher 病の場合と同様に強くみられた。

対照(5例), type 1 Gaucher 病(3例), および type 2 Gaucher 病(2例)皮膚線維芽細胞での全上清, light membrane fraction および lysosomal fraction での残存 Glc-cer 量を%であわしたのが Fig. 7 である。残存 Glc-cer%は, 対照で light membrane fraction は全上清よりも多く, 逆に lysosomal fraction は全上清よりも少ない。この light membrane fraction, 全上清 および lysosomal fraction 間の残存 Glc-cer%のパターンは type 1 Gaucher 病, type 2 Gaucher 病でも同様であった。残存 Glc-cer%を対照, type 1 および type 2 Gaucher 病細胞で比較してみると, 全上清,

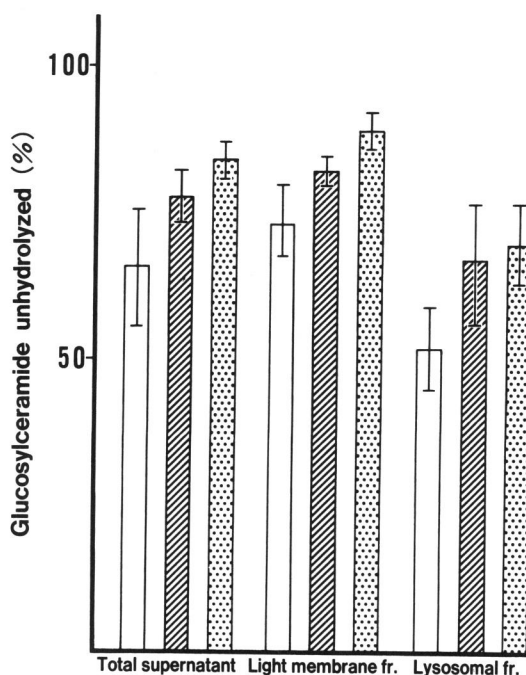


Fig. 7 Percentage of unhydrolyzed glucosylceramide (Glc-cer) in total supernatant, light membrane fraction and lysosomal fraction. Cells were pulsed for 48 h with 40 nmol of ^{14}C -Glc-cer and subjected to the first Percoll gradient (density 1.050 g/ml). In total supernatant, light membrane fraction, and lysosomal fraction, the extracted lipids were separated, and identified from autoradiograms. Each radioactive spot of metabolites was scraped and counted. Values are expressed as mean \pm SD.

- : control (n=5)
- ▨ : type 1 Gaucher disease (n=3)
- ▤ : type 2 Gaucher disease (n=2)

light membrane fraction, lysosomal fraction のいずれでも type 2 Gaucher 病, type 1 Gaucher 病, 対照の順に多い。放射能は light membrane fraction に大部分が分布することから, この fraction に残存する Glc-cer 量は他の fraction に比較して多量である。

3.5 第二 Percoll 密度分画

対照から得られたゴルジ装置と形質膜から成る light membrane fraction を第 2 分画 (Fig. 8) すると, galactosyltransferase 活性は第 14 分画でピークを示し, 5'-nucleotidase 活性と放射能は第 1 から第 12 分画にピークを示し 2 分画された。放射能の分布は 5'-nucleotidase 活性に一致することから, light mem-

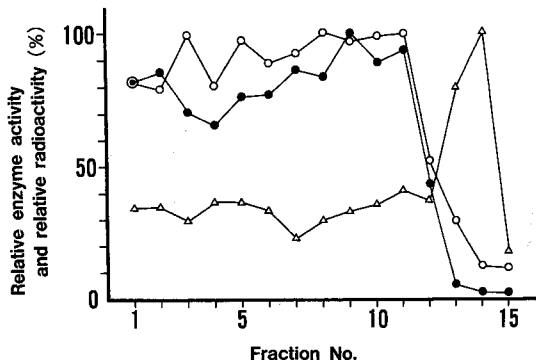


Fig. 8 The second Percoll gradient profiles of radioactivities and the marker enzyme activities of subcellular fractions. Control cell was pulsed for 48 h with 40 nmol of ^{14}C -Glc-cer and subjected to the first Percoll gradient (density 1.050 g/ml) and then fraction 1-4 was subjected to the second Percoll gradient (density 1.044 g/ml). Activities of marker enzymes and radioactivity in each fraction were determined.
 ●; radioactivity ○; 5'-nucleotidase
 △; galactosyltransferase

brane fraction の放射性代謝産物のほとんどは形質膜に存在することが示された。このような分画のパターンは type 1 および type 2 Gaucher 病でも同様であった。これらの結果から、対照および Gaucher 病皮膚線維芽細胞での放射性代謝産物の大部分は形質膜に存在し、残存する ^{14}C -Glc-cer の分布も type 2 Gaucher 病で最も多く、次に type 1 Gaucher 病、対照の順となった。

4 考 察

これまでに Glc-cer の細胞内での代謝については、Glc-cer β -glucosidase が低下している Gaucher 病皮膚線維芽細胞を用いて研究されてきた^{6,9,17)}。細胞内への Glc-cer の取り込みは、Glc-cer-albumin complex として培養液へ懸濁する方法が効果的であることが知られている⁹⁾。この方法を用いて草野⁶⁾は、中枢神経症状を伴い乳児期に死亡する重症の type 2 Gaucher 病では、慢性に経過する成人の type 1 Gaucher 病よりも細胞内 Glc-cer の分解がより障害されていることを報告した。

本研究ではさらに Glc-cer の取り込み条件を変化させ、より効率のよい条件を設定し、取り込み機序について検討した。そして取り込まれた Glc-cer の代謝の、Gaucher 病各 type 間における差異と発現している機能

異常の相関について、細胞を分画して細胞内小器官レベルで検索することを目的とした。

培養液に懸濁された 40 nmole の ^{14}C -Glc-cer の培養皮膚線維芽細胞による取り込みは、Glc-cer-albumin complex の albumin 濃度および培養液中の FCS 濃度の少なくとも 2 つに依存している。特に FCS 濃度の影響は大きく、3~5% が至適濃度であった。Glc-cer は極めて疎水性であり、単独で培養液中に均一に懸濁することは不可能で、たとえ懸濁しても細胞にはほとんど取り込まれない。Glc-cer-albumin complex として再現性のある経時的な取り込みが得られたことは、albumin を介する何らかの機構が存在することが推測された。一般的に albumin は脂肪酸、胆汁酸、ビリルビン、ホルモンあるいは種々の薬物と結合する¹⁸⁾。脂肪酸、タウロコール酸、ローズベンガル-albumin complex は、細胞表面の albumin 受容体を介してラット肝細胞に取り込まれることが知られている^{19,20,21)}。これらの取り込みは albumin を添加することで抑制される。本研究での Glc-cer の取り込みは albumin 濃度の高い complex では低下していた。脂肪酸-albumin complex は albumin 単独よりも数倍多くマウス肺上皮細胞に取り込まれることが知られている²²⁾。その理由については、albumin は脂肪酸との結合により立体構造に変化をきたし、細胞表面の受容体との作用が増強的に修飾されることによると考えられている。これらのことから本研究での Glc-cer-albumin complex は、皮膚線維芽細胞の表面の albumin 受容体を介して、さらには Glc-cer 結合による albumin の立体構造の変化による効果も加わり取り込まれると推測される。

一般的に培養液中の脂質はその存在形態により細胞への取り込み、細胞内分布が異なることが知られている。Glc-cer は、Glc-cer-albumin complex として取り込まれた時には、ライソソームを経て順次代謝される⁶⁾。対照では取り込まれた ^{14}C -Glc-cer は第一にグルコースが遊離してセラミドとなる。このことはライソソームの ceramidase が低下している Farber 病培養皮膚線維芽細胞では、 ^{14}C -Glc-cer がセラミドの段階で代謝ブロックされ細胞内に蓄積することからも証明されている。次にセラミドは、対照では ceramidase により ^{14}C -ステアリン酸が遊離され脂肪酸としてリン脂質の生合成に利用される。

セラミドの場合、Farber 病細胞にセラミド-LDL として取り込ませるとセラミドの代謝ブロックがみられるが、セラミドーリポソームとしてではセラミドは対照と同様に代謝されることが報告されている²³⁾。これは

セラミドの存在形態が異なるために、セラミド-LDLではライソソームに取り込まれ、一方セラミドーリボソームでは細胞内小器官に移動するために対照と同様の代謝を受けると考えられている。この移動についてハムスター線維芽細胞では、取り込まれたセラミドーリボソームのセラミドはミトコンドリア、ゴルジ装置を経て、最終的に形質膜に出現し、スフィンゴミエリンおよびセレブロシド (Glc-cer の可能性) として存在することが知られている¹⁰⁾。この系ではセラミドはライソソームへは取り込まれず、ゴルジ装置で糖転移酵素により糖が付加されることが示唆されている。

Glc-cer についてもその存在形態により同様のことが言える。本研究ではライソソームの Glc-cer β -glucosidase が低下している Gaucher 病では対照に比較して、ライソソーム分画で代謝されずに残存する Glc-cer 量は多く、その量は症状の重い type で多いことが再認識された。ここで問題となるのは Gaucher 病でも取り込まれた Glc-cer の一部がセラミドに分解されていることから、完全な代謝ブロックではないということである。Saito and Rosenberg¹⁷⁾ らは、Glc-cer を Glc-cer-リボソームあるいは Glc-cer だけを培養液中で超音波処理する方法で懸濁し、type 2 Gaucher 病細胞での代謝を検討している。Glc-cer-リボソームではライソソームを経ずに取り込まれるために、前述のセラミドでの報告のように Glc-cer は分解を受けることなく、糖あるいはシアル酸が付加され、高級スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドに変換されている。一方、Glc-cer 超音波処理ではライソソームに取り込まれ、Gaucher 病では Glc-cer β -glucosidase が低下しているためその 83% は分解されないが、残りは糖が付加されて代謝され、主にラクトシルセラミド、GM3 ガングリオシドとなっている。いずれの場合も Glc-cer は、形質膜などの構成成分として新たな糖脂質となりライソソーム内での蓄積が避けられるとしている。また Barton and Rosenberg⁹⁾ の研究では、Glc-cer を albumin と共に培養液に懸濁しているが、対照では Glc-cer は分解の経路で、一方 Gaucher 病では合成の経路で代謝されていると報告している。しかしながら、本研究では Gaucher 病でも合成系で代謝されるのではなく、Glc-cer の分解により代謝されていることが示され大きな相違点となった。この分解は残存している酵素活性によるものと考えたい。

本研究で最も特徴的な結果は、対照、Gaucher 病 type 1 および type 2 でも、取り込まれた Glc-cer の放射能分布が最も高いのが形質膜とゴルジ装置分画を合

わせたいわゆる light membrane fraction にあったことである。この light membrane fraction の放射能のほとんどは引き続き第 2 回の分画から形質膜に存在することが明らかになった。つまり、放射能分布は形質膜に最も多く、その主要な放射性物質は Glc-cer である。このような細胞内分布の説明として (1) ライソソームに一旦取り込まれた Glc-cer が、代謝される時間の経過とともに形質膜へ移動、(2) ライソソームの比重が Glc-cer-albumin complex を取り込んだことによる変化、(3) 異なった比重のライソソームの存在などによる分画の限界性、が考えられる。もちろん細胞のホモジネートを調製する際、ライソソームの破壊による Glc-cer の漏出も無視することはできないが、各分画の標識酵素の測定からは各々の主要部分を分画していると考えられるので、後者二つの可能性は低い。いずれにせよ、対照、Gaucher 病 type 1 および type 2 でも形質膜に Glc-cer は存在し、その分布は症状の重い type 2, type 1 の順に高い。このことは Gaucher 病では Glc-cer はライソソームのみならず線維芽細胞形質膜に蓄積し、膜の脂質構成に変化をきたすことになる。このような変化が神経細胞に生ずるならば、明らかに機能異常が引き起こされ、その程度は変化と相関し病型の差となることが本研究の結果から推測される。

最近遺伝子治療を目的としてレトロウイルスを用いたヒト Glc-cer β -glucosidase 遺伝子のマウス骨髄細胞への導入が試みられているが^{24,25)}、これらの実験では骨髄細胞へ遺伝子が導入されたことの証明として DNA, RNA レベルでは southern blotting, northern blotting を行い、蛋白レベルでは Glc-cer β -glucosidase に対するモノクローナル抗体を用いて western blotting, 免疫組織化学染色を行っている。さらに酵素活性の面からは 4-MU- β -D-glucopyranoside を用いた *in vitro* 酵素活性を測定している。しかし、遺伝子導入後の細胞レベルの構造あるいは機能の変化については触れられていない。遺伝子導入後、Glc-cer β -glucosidase 活性が発現し Glc-cer の代謝が正常化することを確認するためには本研究で述べた方法の応用が今後期待される。

5 結 語

皮膚線維芽細胞の ¹⁴C-Glc-cer-albumin の取り込みに影響を及ぼす因子について研究した。つづいて、研究結果より設定した条件で ¹⁴C-Glc-cer を取り込んだ対照、type 1 および type 2 Gaucher 病皮膚線維芽細胞を分画し、Glc-cer の細胞内代謝、細胞内分布について

検討を行った。その結果は以下のとおりである。

- 1) 培養皮膚線維芽細胞による ^{14}C -Glc-cer の取り込みは, ^{14}C -Glc-cer-albumin complex の albumin 濃度および培養液中の FCS 濃度の少なくとも 2 つに依存していた。
- 2) ^{14}C -Glc-cer を取り込んだ細胞を分画することにより, 放射能のほとんどは形質膜に存在し, その主要な放射性物質は Glc-cer であることが明らかになった。
- 3) 残存 Glc-cer% は全上清, light membrane fraction, lysosomal fraction のいずれでも type 2 Gaucher 病, type 1 Gaucher 病, 対照の順に多くなっていた。light membrane fraction の放射性代謝産物の大部分は形質膜に存在したことにより, 病状の重い type 2 Gaucher 病, type 1 Gaucher 病の順により多くの Glc-cer が形質膜に蓄積していた。同様の膜脂質構成の変化が神経細胞に生じるならば, その変化の程度が病型と関連することが本研究の結果から推測された。

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲をいただいた札幌医科大学小児科学講座千葉峻三教授, 研究に際して適切な御助言を下さった草野 孝博士に深謝いたします。

文 献

1. Nilsson, O., Grabowski, G. A., Ludman, M. D., Desnick, R. J. and Svennerholm, L.: Glycosphingolipid studies of visceral tissues and brain from type 1 Gaucher disease variants. *Clin. Genet.* **27**, 443-450 (1985).
2. Kaye, B. M., Ullman, M. D., Wilson, E. R. and Barranger, J. A.: Type 2 and Type 3 Gaucher disease: A morphological and biochemical study. *Ann. Neurol.* **20**, 223-230 (1986).
3. Conradi, N. G., Sourander, P., Nilsson, O., Svennerholm, L. and Erikson, A.: Neuropathy of the Norrbottnian type of Gaucher disease. *Acta, Neuropathol. (Berl.)* **65**, 99-109 (1984).
4. Nilsson, O. and Svennerholm, L.: Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. *J. Neurochem.* **39**, 709-718 (1982).
5. Banker, B. Q., Miller, J. O. and Crocker, A. C.: The cerebral pathology of infantile Gaucher's disease, In: Aronson, S. M. and Volk, B. W.: Cerebral Sphingolipidoses. 73-99, Academic Press New York (1962).
6. 草野 孝: 培養皮膚線維芽細胞における Glucosylceramide の代謝に関する研究. *札幌医誌* **55**, 523-531 (1986).
7. Erickson, J. S. and Radin, N. S.: N-Hexyl-O-glucosyl sphingosine, an inhibitor of glucosyl ceramide β -glucosidase. *J. Lipid Res.* **14**, 133-137 (1973).
8. Ledeen, R. and Salsman, K.: Fatty acid long chain base composition of adrenal medulla gangliosides. *Lipids* **5**, 751-756 (1970).
9. Barton, N. W. and Rosenberg, A.: Metabolism of glucosyl [^3H] ceramide by human skin fibroblasts from normal and glucosylceramidotic subjects. *J. Biol. Chem.* **250**, 3966-3971 (1974).
10. Lipsky, N. G. and Pagano, R. E.: Intracellular translocation of fluorescent sphingolipids in cultured fibroblasts: Endogeneously synthesized sphingomyelin and glucocerebroside analogues pass through the Golgi apparatus en route to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **100**, 27-34 (1985).
11. Morré, D. J.: Isolation of Golgi apparatus, In: Jakoby, W. B.: *Methods Enzymol.* **22**, 130-148, Academic Press, New York (1971).
12. Wenger, D. A., Sattler, M., Clark, C., Tanaka, H., Suzuki, K. and Dawson, G.: Lactosyl ceramidosis: Normal activity for two lactosyl ceramide β -galactosidase. *Science* **188**, 1310-1312 (1975).
13. Sandhoff, K., Conzelmann, E. and Nehr Korn, H.: Specificity of human liver hexosaminidases A and B against glycosphingolipids GM₂ and GM₃. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **358**, 779-787 (1977).
14. Banerjee, A., Burg, J., Conzelmann, E., Carroll, M. and Sandhoff, K.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the ganglioside GM₂-activator protein. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **365**, 347-356 (1984).
15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
16. Merion, M. and Sly, W. S.: The role of intermediate vesicles in the adsorptive endocytosis and transport of ligand to lysosomes by human fibroblasts. *J. Cell Biol.* **96**, 644-650 (1983).
17. Saito, M. and Rosenberg, A.: The fate of glucosylceramide (glucocerebroside) in genetically impaired (lysosomal β -glucosidase deficient) Gaucher disease diploid human fibroblasts. *J.*

- Biol. Chem.** **260**, 2295-2300 (1985).
18. Peters, Th., Jr.: Serum Albumin, In: Anfinsen, C. B., Edsall, J. T. and Richard, F. M.: *Advance in Protein Chemistry*. 161-245, Academic Press, Orland (1985).
 19. Weisiger, R., Gollan, J. and Ockner, R.: Receptor for albumin on the liver cell surface may mediate uptake of fatty acids and other albumin-bound substances. **Science** **211**, 1048-1051 (1981).
 20. Forker, E. L. and Luxon, B. A.: Albumin helps mediate removal of taurocholate by rat liver. **J. Clin. Invest.** **67**, 1517-1522 (1981).
 21. Forker, E. L. and Luxon, B. A.: Albumin-mediated transport of rose bengal by perfused rat liver. **J. Clin. Invest.** **72**, 1764-1771 (1983).
 22. Galis, Z., Ghitescu, L. and Simionescu, M.: Fatty acids binding to albumin increases its uptake and transcytosis by the lung capillary endothelium. **Eur. J. Cell Biol.** **47**, 358-365 (1988).
 23. Sutrina, S. L. and Chen, W. W.: Metabolism of ceramide-containing endocytotic vesicles in human diploid fibroblasts. **J. Biol. Chem.** **257**, 3039-3044 (1982).
 24. Nolta, J. A., Sender, L. S., Barranger, J. A. and Kohn, D. B.: Expression of human glucocerebrosidase in murine long-term bone marrow cultures after retroviral vector-mediated transfer. **Blood** **75**, 787-797 (1990).
 25. Correll, P. H., Fink, J. K., Brady, R. O., Perry, L. K. and Karlsson, S.: Production of human glucocerebrosidase in mice after retroviral gene transfer into multipotential hematopoietic progenitor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**, 8912-8916 (1989).
-
- 別刷請求先：
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学小児科学講座 杉山 元